

ساخت و ارزیابی خواص مورفولوژیکی، شیمیایی و زیست تخریب پذیری داربست نانو فیبری پلی-ال-لاکتیک-اسید (PLLA) و کاربرد آن در مهندسی بافت عصب

وحیده میری^{۱،۲}، فریبا منصوری زاده^{۳،۴}، محسن سقا^۵، اسداله اسدی^۶، محمد قاسم گل محمدی^۷

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۷/۱۵ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۰۹/۲۹

چکیده

پیش زمینه و هدف: مهندسی بافت عصب یکی از امیدوارکننده ترین روش ها برای درمان ضایعات دژنراتیو سیستم عصبی مرکزی می باشد. توزیع سه بعدی و رشد سلول ها درون داربست متخلخل از اهمیت بالینی برای مهندسی بافت عصب برخوردار می باشد. داربست های مورد استفاده در مهندسی بافت علاوه بر عملکرد مناسب باید زیست سازگار، زیست تخریب پذیر و متخلخل نیز باشند. ما در این مطالعه به دنبال ساخت و مطالعه ویژگی های یاد شده در داربست پلی-ال-لاکتیک-اسید (PLLA) به منظور کاربرد آن در مهندسی بافت عصب هستیم.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی نانو داربست PLLA با ساختار و مورفولوژی مناسب به وسیله روش الکتروریسی تهیه شد. از طیف سنجی مادون قرمز (FTIR, Fourier Transform Infrared) و میکروسکوپ الکترونی نگاره به ترتیب برای تعیین ساختار شیمیایی و فیزیکی داربست استفاده شد. همچنین میزان تخریب پذیری داربست طی ۴۰ روز در داخل محلول فسفات بافرسالی (PBS) مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت سلول های بنیادی جداسازی شده از مغز موش بالغ بر روی داربست کشت داده شد و نحوه اتصال و مورفولوژی آن ها توسط میکروسکوپ الکترونی بررسی گردید.

یافته ها: نتایج کسب شده به وسیله مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان دهنده خصوصیات سطحی مناسب و نانو فیبری بودن داربست ساخته شده بود. طی آزمون تخریب پذیری، مشخص شد که نانو داربست PLLA از سرعت تخریب و خاصیت جذب آب مطلوبی برخوردار است و همچنین pH محیط را کمتر تحت تأثیر قرار می دهد. در نهایت با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی، اتصال موفق سلول های بنیادی و پیش ساز عصبی مغز موش بالغ کشت داده شده بر روی داربست مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

نتیجه گیری: از نتایج به دست آمده به نظر می رسد که نانو داربست PLLA بستر مناسبی برای کشت و تمایز سلول های بنیادی و پیش ساز عصبی بوده و روش به کار رفته روشی کارآمد در ساخت داربستی مناسب برای مهندسی بافت عصب می باشد.

کلیدواژه: مهندسی بافت، داربست، PLLA، الکتروریسی، سلول های بنیادی عصبی، زیست تخریب پذیری

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره یازدهم، ص ۹۹۷-۹۸۸، بهمن ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، تلفن: ۰۹۱۴۳۵۲۳۷۰۶

Email: m.golmohammadi@arums.ac.ir

^۱ کارشناس ارشد زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۲ دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، زاهدان، ایران

^۳ کارشناس ارشد زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

^۴ دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اردبیل، ایران

^۵ استادیار علوم تشریحی، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

^۶ استادیار بیوفیزیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۷ دانشیار علوم تشریحی، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران (نویسنده مسئول)

مقدمه

امروزه سلول درمانی به کمک مهندسی بافت در درمان بسیاری از بیماری‌های دژنراتیو سیستم عصبی مرکزی از جمله پارکینسون، آلزایمر و ضایعات نخاعی استفاده می‌شود (۱). درمان رایجی که برای این گونه بیماری‌ها وجود دارد، استفاده از بافت‌های سالم اطراف بافت آسیب دیده است، ولی به دلیل عوارض ناشی از این گونه روش‌ها از جمله شیوع عفونت‌های پس از اعمال جراحی، محققان مختلف درصدد استفاده از علم میان رشته‌ای مهندسی بافت عصب برای تولید جایگزین‌های زیستی مناسب برآمدند. ترمیم سیستم عصبی پدیده زیستی پیچیده‌ای است، به طوری که ضایعات کوچک در سیستم عصبی محیطی قابلیت ترمیم داشته در حالی که جراحات بزرگ‌تر باید از طریق جراحی و پیوند اعصاب محیطی ترمیم شود (۱-۳). این در حالی است که ترمیم ضایعات سیستم عصب مرکزی از جمله نخاع در این میان پیچیده‌تر است. آنچه اکنون بسیار مورد توجه واقع شده است کاربرد داربست‌های زیست تخریب پذیر به همراه سلول‌ها و فاکتورهای رشد می‌باشد (۴). مطالعات نشان داده است که لامینین، کلاژن، فیبرونکتین و بسیاری از پروتئوگلیکان‌ها و گلیکوز آمینوگلیکان‌ها و مواد زمینه‌ای خارج سلولی سبب تعدیل فعالیت عصبی و رشد آکسون می‌شوند، موادی مانند هیالورونیک اسید، فیبرینوژن، ژل‌های فیبرینی، آلژینات، آگارز و کیتوسان در ترمیم ضایعات عصبی بکار برده شده‌اند (۵). همچنین تحقیقات فراوانی بر روی داربست‌های مصنوعی جهت ترمیم عصب استفاده شده است. تعدادی از مواد سنتزی که جهت کمک در ترمیم عصب مؤثر هستند عبارت‌اند از: پلی استرها از جمله پلی گلیکولیک اسید (PGA)، پلی لاکتیک اسید (PLA) و کوپلیمر آن‌ها و همچنین ترکیباتی مانند پلی اورتان، پلی ۳- هیدروکسی بوتیرات و پلی فسفاژن (۵-۷).

پلی هیدروکسی اسیدی مثل پلی-ال-لاکتیک اسید (PLLA) به دلیل خاصیت زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری ذاتی از جمله پلیمرهای سنتزی می‌باشد که امروزه کاربرد گسترده‌ای در عرصه پزشکی و مهندسی بافت دارد (۸). یانگ و همکاران داربست متخلخل PLLA را با استفاده از روش دستی جداسازی فاز مایع-مایع تهیه کردند و بعد از بررسی خصوصیات داربست، رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی جدا شده از مخچه را بر روی آن مورد بررسی قرار دادند (۹). در مطالعه‌ی دیگر بل و همکاران واکنش سنتز و سرعت تجزیه شدن پلیمر PLLA را در محیط مشابه بدن انسان مورد مطالعه قرار دادند (۱۰). منصوری زاده و همکاران نیز داربست PLLA را با استفاده از روش الکتروریسی تهیه نموده و موفق شدند کشت و تمایز سلول‌های بنیادی بند ناف جنین انسانی را در سطح داربست مورد بررسی قرار دهند (۱۱).

در مطالعه حاضر به منظور ساخت یک داربست پلیمری مناسب جهت استفاده در مهندسی بافت عصب داربست پلیمری PLLA به روش الکتروریسی به صورت فیبرهای تصادفی (۱۲) در محیط

آزمایشگاه با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و طی ۶ ساعت، با استفاده از حلال کلروفرم و دی متیل فرمالدهید (DMF) سنتز شد و با توجه به اینکه PLLA بطور ذاتی آبگریز بوده و ممکن است منجر به ایجاد واکنش‌های خارجی در بدن از جمله: التهاب، عفونت، شل شدن آسپتیک یا ضایعات داخلی شود، لذا برای کاهش آبگریزی و تقویت اتصال سلول بر روی این ماده پلیمری، تیمار با پلاسما بر روی سطح داربست انجام گرفت (۱۳، ۱۴) و خواص مورفولوژیکی، شیمیایی و زیست تخریب پذیری این داربست نانو فیبری به منظور کاربرد آن در مهندسی بافت عصب مورد ارزیابی قرار گرفت؛ و در نهایت برای اولین بار در این مطالعه نحوه رشد و اتصال سلول‌های بنیادی و پیش ساز عصبی جدا شده از ناحیه تحت بطنی مغز موش بالغ بر روی داربست فوق مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ساخت داربست پلیمری PLLA به روش الکتروریسی: به این منظور از دستگاه الکتروریسی (Diener Electronics, Germany) که شامل یک پمپ سرنگی برای تزریق محلول پلیمر و یک منبع تولید ولتاژ قوی بین صفحه جمع کننده و پمپ تغذیه می‌باشد، استفاده شد. ابتدا پلیمر PLLA (Sigma-Aldrich, Germany) با ویسکوزیته ذاتی یک، در حلال کلروفرم و دی متیل فرمالدهید (۸ V/V درصد، Sigma-Aldrich, Germany) کاملاً حل شد تا تعلیق پایدار ایجاد شود. سپس محلول الکتروریسی در سرنگ ۵ میلی لیتری که دارای سوزنی با قطر داخلی ۰/۵ میلی متر بود، قرار گرفت. سوزن سرنگ به جریان ولتاژ و الکترودهی به سطح ورقه آلومینیومی متصل گردید. سرعت تزریق محلول برابر ۰/۴ میلی لیتر در ساعت تنظیم شد و بین سوزن و جمع کننده، ولتاژ قوی ۱۵ کیلو ولت ایجاد شد. نانو الیاف تشکیل شده، بر روی ورق آلومینیومی که در فاصله ۱۵ سانتیمتری از نوک سوزن قرار داشت، جمع آوری شد. الکتروریسی در محیط آزمایشگاه با دمای حدود ۲۵ درجه سانتی گراد طی ۶ ساعت انجام شد (۱۵). معمولاً به منظور افزایش درصد اتصال سلول به داربست، با استفاده از تکنیک تیمار پلاسما ویژگی سطح داربست در راستای افزایش نشست سلولی تغییر داده می‌شود. تیمار پلاسما به طور معمول توسط اکسیژن انجام می‌شود که گروه‌های آمین و کربوکسیل را بر روی سطح تولید می‌کند (۱۶). در این مطالعه نیز تیمار با پلاسما توسط گاز اکسیژن تحت فشار ۰/۴ میلی بار و به مدت ۴ دقیقه انجام شد.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی عصبی مشتق شده از مغز موش بالغ:

جهت انجام آزمایشات کشت سلولی از سلول‌های بنیادی و پیش ساز عصبی جدا شده از ناحیه‌ی تحت بطنی مغز موش بالغ استفاده گردید. نوروسفرهای حاصل از تکثیر سلول‌های بنیادی و پیش ساز عصبی با استفاده از Sigma-Triple-EDTA) استفاده

می‌توانند برای اهداف مقایسه‌ای به کار روند (۱۹). نمونه‌ی داربست در گستره‌ی عدد موج ۴۰۰-۴۰۰۰ آنالیز شد.

کشت سلول‌های بنیادی و پیش ساز عصبی بر روی داربست PLLA:

ابتدا هر قطعه داربست در ابعاد $1 \times 1 \text{ cm}^2$ به مدت ۲۴ ساعت در اتانول ۷۰ درصد غوطه ور و پس از خشک شدن در دمای اتاق، دو طرف داربست، هر کدام به مدت ۱ ساعت با قرار گرفتن تحت اشعه UV استریل شد. قطعات داربست درون چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه با PBS شستشو داده شدند و به مدت سه ساعت تحت تیمار PBS در انکوباتور با ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در مرحله بعد بافر تخلیه شد و سلول‌های بنیادی و پیش ساز عصبی در تراکم 1×10^4 سلول در ۲۰ میکرولیتر با روش چکاندن روی داربست قرار داده شدند؛ و پلیت حاوی داربست به مدت سه ساعت به منظور نفوذ کامل سلول‌ها درون داربست، در انکوباتور قرار گرفت. سپس ۵۰۰ میکرولیتر محیط NSA (Neurosphere Assay) حاوی ۱۰ درصد FBS و آنتی بیوتیک (پنی سیلین - استرپتومایسین یک درصد، Gibco) به محیط داربست اضافه شد.

بررسی اتصال سلول بر روی داربست به وسیله تصاویر SEM: اتصال سلول‌ها و مورفولوژی آن‌ها بر روی سطح داربست با بررسی تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی (SEM) مورد مطالعه قرار گرفت. به همین منظور ۲۴ ساعت بعد از کشت سلول‌ها بر روی داربست‌های مختلف، نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه تحت تیمار محلول پارافرمالدهید ۴ درصد فیکس شده و سپس توسط آب مقطر شستشو داده شد و بعد از خشک شدن، نمونه‌ها با طلا پوشش داده شده و برای عکس برداری آماده شد. آنالیز آماری:

در این مطالعه تجربی داده‌های کیفی به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شد. این داده‌ها طی سه تکرار مستقل از هم به دست آمدند. جهت مقایسه داده‌ها نسبت به هم از آزمون‌های Independent Sample T-test و نیز Tukey, spost hoc یک طرفه و نیز test استفاده شد.

نتایج

مطالعات میکروسکوپ الکترونی:

تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده از سطح داربست PLLA در دو بزرگنمایی متفاوت در شکل ۱ آمده است. داربست نانوفیبری دارای ساختمان متخلخل با منافذ مرتبط بهم والیاف باریک است.

(Aldrich, St Louis, USA) به صورت سوسپانسیون تک سلولی در آمده و با استفاده از تریپان بلو (Gibco) شمارش شدند (۱۷).

تعیین خصوصیات داربست:

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی نانو داربست پلیمری PLLA: به منظور بررسی ویژگی‌های سطحی و اندازه منافذ در سطح داربست PLLA، تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (LEO1430VP) تهیه شد که به این منظور ابتدا داربست به قطعات کوچک بریده شد و سپس پوشش طلا داده شد. سپس زیست‌تخریب‌پذیری داربست:

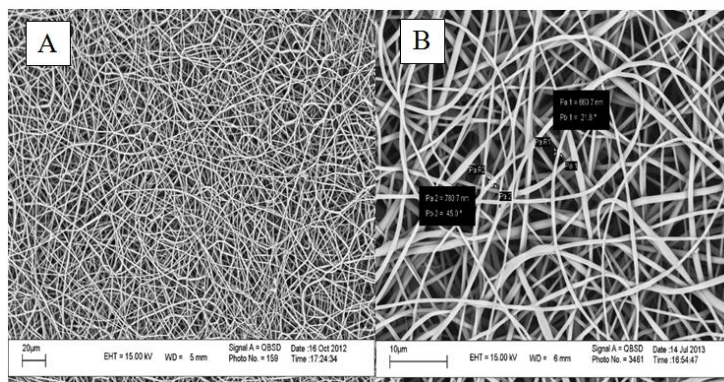
مطالعه تخریب پذیری داربست پلیمری PLLA در محلول بافر فسفات (PBS, Gibco) در محیط آزمایشگاهی و در pH ۷/۴، انجام شد. ۲۴ قطعه داربست به ابعاد $1 \times 1 \text{ cm}^2$ توزین شدند. سپس به منظور استریل کردن، نمونه‌ها به مدت یک شب در اتانول (Aldrich, St Louis, USA) غوطه ور شده و پس از آن به مدت یک ساعت در معرض اشعه فرابنفش قرار گرفتند. داربست هادر ۸ عدد لوله فالكون حاوی ۱۰ میلی لیتر PBS قرار داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. طول دوره انکوباسیون ۴۰ روز در نظر گرفته شد و هر ۵ روز ۳ تا از نمونه‌ها از بافر خارج شده و پس از اندازه گیری PH بافر، آب سطح نمونه‌ها توسط کاغذ صافی گرفته شد و سپس نمونه‌ها وزن شدند (Wa). به منظور خارج نمودن نمک‌های معدنی محلول، همان نمونه‌ها با مقدار زیادی آب دو بار تقطیر شسته و در دمای اتاق خشک شدند. نمونه‌های خشک شده نیز توزین شده و وزن آن‌ها ثبت گردید (Wt). با استفاده از رابطه‌های زیر، در صد جذب آب (WA)، کاهش وزن (WL) داربست‌ها و نیز تغییرات PH بافرها محاسبه و نمودارهای مربوط به آن‌ها رسم گردید (۱۶، ۱۸). این آزمایش سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین ارائه شده است.

$$\text{رابطه ۱: } W_A\% = (w_a - w_0) / w_0 \times 100$$

$$\text{رابطه ۲: } W_L\% = (w_l - w_0) / w_0 \times 100$$

طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR):

طیف‌سنجی مادون قرمز (Fourier Transform Infrared) بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی ملکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. این روش به عنوان روشی پر قدرت و توسعه یافته برای تعیین ساختار و اندازه‌های گونه‌های شیمیایی به کار می‌رود. این روش عمدتاً برای شناسایی ترکیبات عالی به کار می‌رود، زیرا طیف‌های این ترکیبات معمولاً پیچیده هستند و تعداد زیادی پیک‌های ماکسیمم و مینیمم دارند که



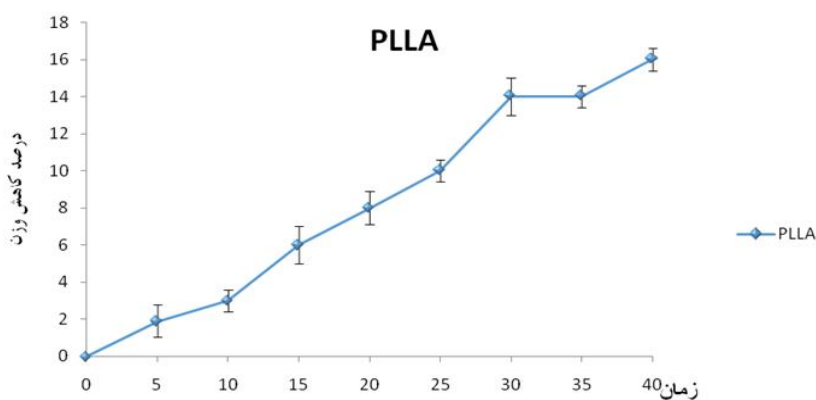
شکل (۱): الکترومیکروگراف SEM از سطح داربست PLLA، (A) ۱۰۰۰X، (B) ۵۰۰۰X

ابتدای زمان تخریب تا پایان ۴۰ روز در داربست افزایش نشان داد و نرخ تخریب داربست در انتهای دوره تخریب به عدد ۱۶ درصد رسید.

سنجش تخریب پذیری داربست:

کاهش وزن داربست:

تغییرات وزن داربست در طی زیست تخریب پذیری در یک دوره ۴۰ روزه در بافر فسفات انجام شد. درصد کاهش وزن از



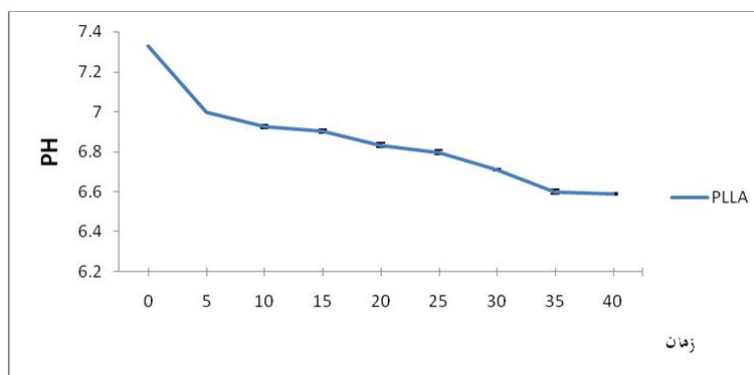
شکل (۲): نمودار خطی کاهش وزن داربست در تست تخریب پذیری

صعودی داشت و حداکثر میزان جذب آب مقدار ۲۶۰ درصد را نشان داد. از روز پنجم به بعد با پیشروی تخریب داربست میزان جذب آب داربست روند نزولی را نشان می‌دهد.

جذب آب داربست:

توانایی جذب آب داربست در شکل ۳ گزارش شده است.

مطابق نتایج، میزان جذب آب در داربست طی ۵ روز اول سیر

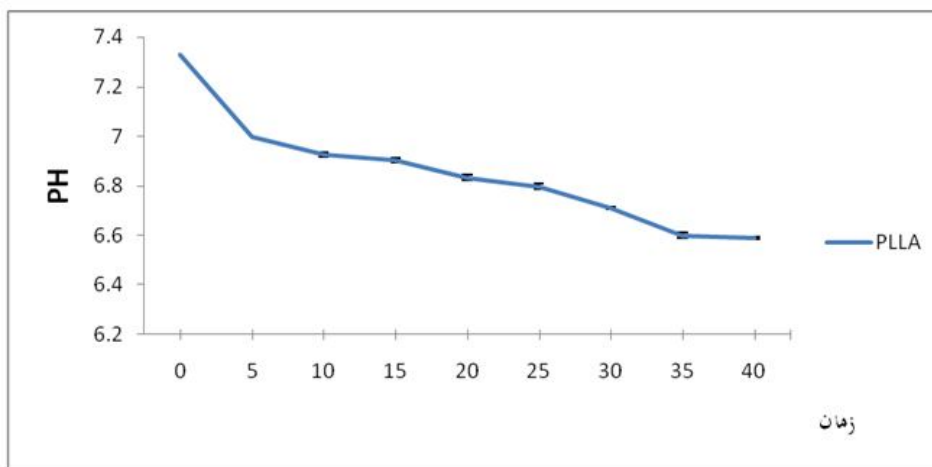


شکل (۳): نمودار جذب آب داربست در تست تخریب پذیری

تغییرات pH:

به خود گرفت. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود طی ۱۰ روز آخر تخریب پذیری، میزان pH به مقدار ثابت ۶/۶ رسیده است.

ارزیابی pH بافرهایی که تخریب داربست در آن صورت گرفت، نشان‌دهنده کاهش pH بود. بیشترین کاهش pH در انتهای روز ۵ مشاهده شد و طی روزهای بعد روند نزولی pH سرعت آهسته‌تری

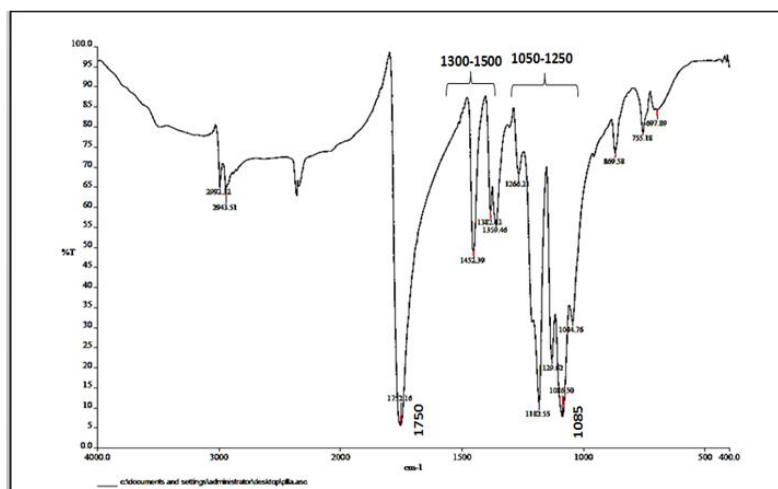


شکل (۴): نمودار تغییر pH بافر در تست تخریب پذیری

طیف‌سنجی FTIR:

C-O حاصل از گروه استری PLLA است. پیک جذبی ناحیه ۱۴۵۰-۱۳۵۰ مربوط به خمش نامتقارن گروه -CH₂- است. پیک ظاهر شده در ناحیه ۱۷۴۷ مربوط به گروه عاملی C=O است. پیک موجود در ناحیه ۲۹۶۰ مربوط به کشش C-H گروه CH₃ می‌باشد (۲۰).

طیف‌سنجی FTIR (Thermo Scientific) نمونه داربست در شکل ۵ نشان داده شده است. پیک جذبی در ناحیه ۸۷۳ مربوط به کشش گروه C=O می‌باشد. پیک جذبی در ناحیه ۱۰۳۶ نشان‌دهنده‌ی کشش



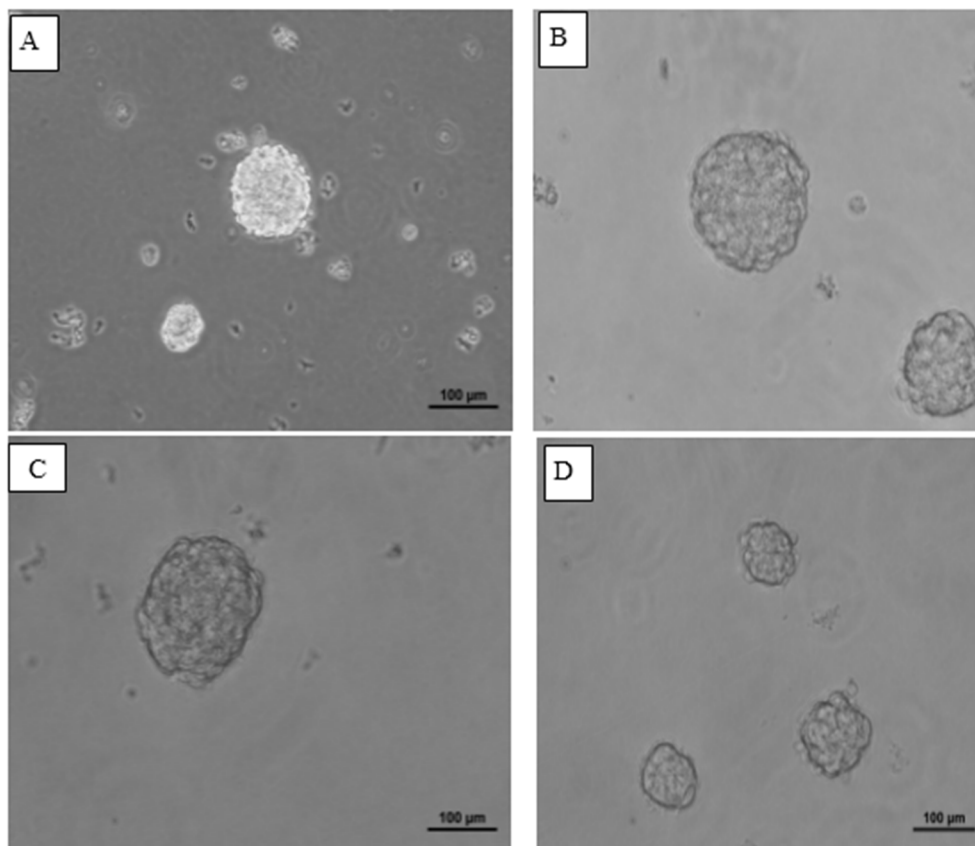
شکل (۵): طیف‌سنجی FTIR مربوط به داربست PLLA

داده شدند. در این روش از محیط کشت فاقد سرم که حاوی فاکتورهای رشد bFGF و EGF بود، استفاده شد. در این محیط سلول‌های تمایز یافته سیستم عصبی مرکزی قادر به رشد و بقا نبوده و در طی دو تا سه روز اول از بین رفتند، درحالی‌که

کشت سلول‌های بنیادی و پیش ساز عصبی مشتق شده از مغز موش بالغ بر روی داربست: سلول‌های بنیادی و پیش ساز عصبی با استفاده از روش نوروسفر از ناحیه‌ی تحت بطنی مغز موش بالغ جداسازی و کشت

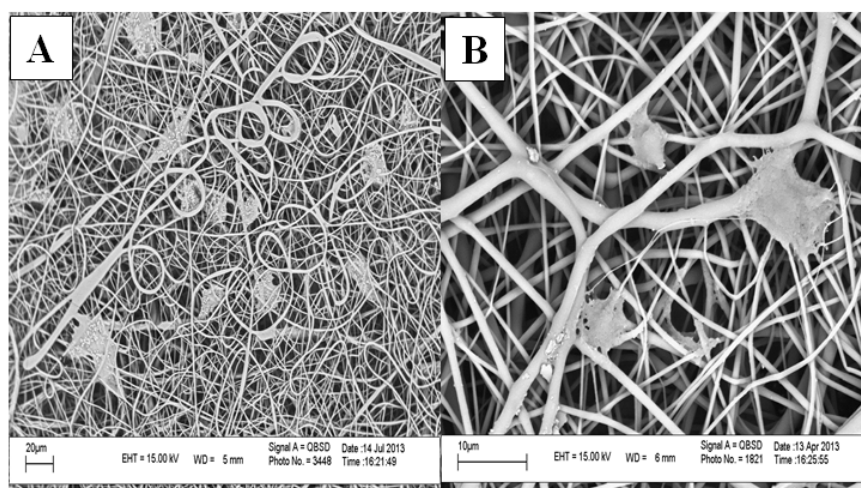
نوروسفرهای ثانویه بر روی داربست با استفاده از تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت. تصاویر نشان‌دهنده‌ی اتصال موفق سلول‌ها بر روی داربست است (شکل ۷).

سلول‌های بنیادی و پیش‌سازعصبی حتی در تراکم بسیار پائین سلولی نیز وارد فاز تکثیر شده و کلونیهایی چندظرفیتی یا نوروسفرها (شکل ۶A, B) را ایجاد نمودند. با پاساژ دادن نوروسفرهای اولیه، نوروسفرهای ثانویه (شکل ۶C, D) بیشتری ایجاد گردید. مورفولوژی و نحوه‌ی اتصال سلول‌های بدست آمده از



شکل (۶): فتومیکروگراف حاصل از NSCs استخراج شده از ناحیه‌ی تحت بطنی.

(A, B) نوروسفرهای حاصل از کشت اولیه. (C, D) نوروسفرهای حاصل از پاساژ اول و دوم (P₂, P₁).



شکل (۷): الکترومیکروگراف SEM از اتصال سلول‌های بنیادی عصبی بر روی داربست PLLA دو روز بعد از کشت. (A) ۱۰۰۰X،

(B) ۵۰۰۰X

بحث

در این مطالعه ساخت داربست نانو فیبری PLLA با روش الکترورسی انجام شد و سلول های بنیادی و پیش ساز عصبی جدا شده از ناحیه تحت بطنی مغز موش سوری بالغ بر روی این داربست با موفقیت کشت داده شد. همچنین برای کاهش آبریزی و تقویت اتصال سلول بر روی این ماده پلیمری از تیمار با پلاسما استفاده شد. برای کاهش آبریزی و تقویت اتصال سلول بر روی داربست PLLA، تلاش های زیادی صورت گرفته است. از جمله Park و همکاران از مسیرهای اصلاح شیمیایی جهت رفع آب گریزی سطح داربست PLLA استفاده کرده و داربست را تحت تیمار پلاسمای اکسیژن و اسیداکریلیک (AA) قرار دادند که نتایج بیانگر افزایش توانایی داربست PLLA پیوند یافته با AA درحمایت از تکثیر سلول های فیبروپلاستی NIH - 3T3 نسبت به داربست تیمار نشده بود (۲۱). در مطالعه ی حاضر جهت غلبه بر این قبیل موارد، تیمار با پلاسما بر روی سطح داربست ها انجام گرفت. مطابق با مطالعات پیشین تیمار پلاسما بسیار آسان تر از روش های شیمیایی دیگر سطح داربست PLLA را بهبود می بخشد. فناوری پلاسما همچنین می تواند گروه های عملکردی فعال، بر روی زنجیرهای پلیمری PLLA را القا کند و توسط واکنش با آن ها انواع مولکول های زیستی همچون پروتئین ها یا پپتیدها می توانند در سطح داربست تجمع یابند. با استفاده از این روش در مطالعه ما گروه های عملکردی C-O در سطح داربست القاء شدند و به این ترتیب امکان ایجاد پیوند هیدروژنی با مولکول های آب را فراهم آورده و خواص جذب آب داربست را بطور قابل ملاحظه ای افزایش داد (۲۲-۲۴).

در این بررسی به منظور تأیید فعل و انفعالات فیزیکی و شیمیایی ایجاد شده در سطح داربست آنالیز FTIR صورت گرفت که حضور پیک جذبی مربوط به گروه C-O و P-OH تأییدی بر وجود پیوند هیدروژنی بین آنها بود (۲۵). همانطور که در نتایج حاضر نشان داده شده است (شکل ۷) داربست آبدوست محیط مطلوب و بهتری را جهت اتصال و رشد سلول فراهم می آورد به دلیل آرایش تصادفی نانوالیاف، سلول های بنیادی عصبی به خوبی در تمامی جهات گسترش می یابند. با توجه به تصاویر می توان به این نکته پی برد که سلول ها دارای زوائد سیتوپلاسمی و ریخت شناسی طبیعی می باشند که اغلب به شکل کلنی های سلولی درآمده و با سلول های مجاور ارتباطات متقابلی را ایجاد می نمایند. همچنین نتایج نشان دادند که سلول ها نه تنها توانایی اتصال و تکثیر مناسبی را روی داربست دارند، بلکه به لحاظ ریخت شناسی نیز از شرایط طبیعی برخوردار هستند. در واقع حضور نانو داربست، جذب فیبرونکتین و ویتروکتین ها را از سرم افزایش می دهد که این امر باعث پیش برد اتصال اینتگرینی آن ها به غشای سلولی می شود (۲۴).

نمودار نتایج تغییرات وزن داربست ها در طی تست زیست تخریب پذیری که در یک دوره ی ۴۰ روزه در بافر فسفات انجام شده است نشان دهنده کاهش وزن داربست با گذشت زمان است. عده ای از محققان اشاره کرده اند که داربست دارای الیاف با قطر کوچک تر نسبت به داربست با قطر بزرگ تر تخریب بیشتری را نشان می دهند، به این دلیل که نسبت سطح به حجم الیاف افزایش یافته و سرعت تخریب بالا می رود (۲۶، ۲۷) در مطالعه حاضر، بررسی مورفولوژیکی داربست PLLA با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده ی سطوح متخلخل با منافذ مرتبط به هم می باشد که قطر فیبرها تقریباً بین نانومتر و میکرومتر متغیر است.

بررسی pH بافر مربوط به داربست طی مراحل تخریب نشان دهنده ی کاهش pH بوده است. مطابق داده ها، مقدار pH در طی ۵ روز اول با شدت بیشتری کاهش یافته است و طی روزهای بعد سرعت کاهش آهسته تر بوده است. در توجیه این نکته می توان اشاره کرد که با القاء آبدوستی داربست طی فرایند تیمار پلاسما داربست تحت تماس مستقیم با آب قرار گرفته و اسیدهای بوتیریک و کرتونیک ناشی از تخریب PLLA باعث اسیدی تر شدن PBS و در نتیجه کاهش PH شده است (۲۸). در حالت عادی PH بدن بین ۷/۴ تا ۷/۶ قرار دارد. در مورد داربست های مناسب عدم تغییر ناگهانی و زیاد از حد PH طی فرایند تخریب از ویژگی های مهم می باشد. در این تحقیق تغییرات pH بافر فسفات داربست روند کاهشی را نشان می دهد اما در نهایت به یک میزان ثابتی رسیده و مقدار نهایی نزدیک ۷ است.

توانایی جذب آب داربست در نمودار ۳ گزارش شده است. مطابق نتایج، میزان جذب آب داربست طی ۵ روز اول سیر صعودی دارد. از روز ۵ ام به بعد با پیشروی تخریب و شروع به از هم پاشیدگی داربست میزان جذب آب روند کاهشی را در داربست نشان می دهد. این افزایش جذب آب داربست به علت تغییر خصوصیت آبریزی و افزایش ویژگی ترشوندگی داربست می باشد. با افزایش ترشوندگی، داربست در تماس مستقیم با آب قرار می گیرد و از طرفی نانو ذرات از سطح دور می شوند. به هر حال در ادامه این تحقیق بررسی خواص مکانیکی نمونه و تمایز سلول های بنیادی به سلول های عصبی نیاز است بنابراین توصیه می گردد که در تحقیقات بعدی با عنایت به نیاز مبرم به این قبیل ترکیبات، ویژگی القاء عصب سازی، دوز مناسب و مؤثر بودنش در انسان مورد ارزیابی و تحقیق بیشتر قرار گیرد.

نتیجه گیری

مطالعه تجربی حاضر نشان می دهد داربست ساخته شده از نظر مورفولوژی، اندازه فیبرها و نوع پلیمر به کاررفته انتخاب مناسبی برای مهندسی بافت عصب می باشد و نانو داربست PLLA می تواند

بعنوان بسترمناسبی برای کشت و تمایز سلول‌های بنیادی و پیش سازعصبی عمل نماید.

بدین وسیله ازمساعدت های علمی و مالی بیدریغ معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل و همچنین آزمایشگاه جنین شناسی و سلول‌های بنیادی این دانشگاه و نیز دانشگاه محقق اردبیلی درانجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

تقدیر و تشکر

References:

1. Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1(1): 102.
2. Nerem RM, Sambanis A. Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue Eng* 1995;1(1):3-13.
3. Fischbach C, Chen R, Matsumoto T, Schmelzle T, Brugge JS, Polverini PJ, et al. Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nat Methods* 2007;4(10):855-60.
4. Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* 2003;5:293-347.
5. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2005;23(1):47-55.
6. Eisenbarth E. Biomaterials for Tissue Engineering. *Adv Eng Mater* 2007;9(12):1051-60.
7. Ifkovits JL, Burdick JA. Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Eng* 2007;13(10):2369-85.
8. Liu X, Holzwarth JM, Ma PX. Functionalized synthetic biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Macromol Biosci* 2012;12(7):911-9.
9. Yang F, Murugan R, Ramakrishna S, Wang X, Ma Y-X, Wang S. Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25(10):1891-900.
10. Bell RB, Kindsfater CS. The use of biodegradable plates and screws to stabilize facial fractures. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64(1):31-9.
11. Mansourizadeh F. PLLA/HA Nano composite scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Molecular Biology Res Communications* 2013. 2(1): 1-10.
12. Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 2008. 49(26): 5603-21.
13. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 2004;199(2):174-80.
14. Yang J. Enhancing the cell affinity of macroporous poly (L-lactide) cell scaffold by a convenient surface modification method. *Polymer international* 2003; 52(12): 1892-9.
15. Prabhakaran MP, Venugopal J, Chan CK, Ramakrishna S. Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Nanotechnology* 2008;19(45):455102.
16. Yoo HS, Kim TG, Park TG. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(12):1033-42.
17. Golmohammadi MG, Blackmore DG, Large B, Azari H, Esfandiary E, Paxinos G, et al. Comparative analysis of the frequency and distribution of stem and progenitor cells in the adult mouse brain. *Stem Cells* 2008;26(4):979-87.
18. Li W-J, Jr JAC. Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering. In: Burdick PDJA, Mauck PDRL, editors. *Biomaterials for Tissue Engineering Applications USA*: Springer Vienna; 2011. p. 47-73.

19. Lao L, Wang Y, Zhu Y, Zhang Y, Gao C. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22(8):1873–84.
20. Torricelli P, Gioffrè M, Fiorani A, Panzavolta S, Gualandi C, Fini M, et al. Co-electrospun gelatin-poly(L-lactic acid) scaffolds: modulation of mechanical properties and chondrocyte response as a function of composition. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014;36:130–8.
21. Park K, Jung HJ, Kim J-J, Ahn K-D, Han DK, Ju YM. Acrylic acid-grafted hydrophilic electrospun nanofibrous poly (L-lactic acid) Scaffold. *Macromol Res* 2006;14(5):552–8.
22. Smith LA, Ma PX. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2004;39(3):125–31.
23. Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25(19):4749–57.
24. Francis L, Venugopal J, Prabhakaran MP, Thavasi V, Marsano E, Ramakrishna S. Simultaneous electrospin-electrosprayed biocomposite nanofibrous scaffolds for bone tissue regeneration. *Acta Biomater* 2010;6(10):4100–9.
25. Hamada Y, Fujitani W, Kawaguchi N, Daito K, Niido T, Uchinaka A, et al. The preparation of PLLA/calcium phosphate hybrid composite and its evaluation of biocompatibility. *Dent Mater J* 2012;31(6):1087–96.
26. Chen VJ, Ma PX. The effect of surface area on the degradation rate of nano-fibrous poly(L-lactic acid) foams. *Biomaterials* 2006;27(20):3708–15.
27. Rebovich M. Electrospinning poly (lactic acid) with a bimodal inter-fiber pore size distribution. New York: Cornell University; 2010.
28. Hakkarainen M. Aliphatic Polyesters: Abiotic and Biotic Degradation and Degradation Products. *Degradable Aliphatic Polyesters* Springer Berlin Heidelberg; 2002. P. 113–38.

FABRICATION AND EVALUATION OF THE MORPHOLOGY, BIODEGRADABILITY, AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE NANO-FIBROUS SCAFFOLD POLY-L-LACTIC-ACID (PLLA) AND ITS APPLICATION IN NEURAL TISSUE ENGINEERING

Vahide Miri^{1,2}, Fariba Mansourizadeh^{3,4}, Mohsen Sagha⁵, Asadollah Asadi⁶, Mohammad Ghasem Golmohammadi^{7*}

Received: 8 Oct, 201; Accepted: 20 Nov, 2014

Abstract

Background & Aims: Nerve tissue engineering (NTE) is one of the most promising methods for the treatment of the central nervous system (CNS) neurodegenerative diseases. The three-dimensional distribution and growth of the cells within the porous of the scaffold have a significance clinical role in the NTE field. Scaffolds used in tissue engineering, not only must have a good performance, but they should also be porous, biocompatible and biodegradable. The present work aimed to fabricate and study the morphology, biodegradability and chemical characteristics of Poly-L-Lactic-Acid (PLLA) in order to use in the neural tissue engineering.

Materials & Methods: In this experimental study, PLLA nano scaffold was fabricated with an appropriate structure and morphology using Electrospinning Technique. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy and Scanning Electron Microscopy (SEM) were used to determine the physico-chemical properties of the scaffold. Scaffold biodegradation was studied in Phosphate-buffered saline (PBS) for 40 days. Isolated stem and progenitor cells from subventricular zone of the adult mouse brain were cultured on the scaffold and their morphology and connection properties were characterized using SEM.

Results: SEM studies indicated that PLLA is a nano-fibrous scaffold which shows the appropriate surface characteristics. Furthermore, this nanoscaffold showed a high degradation and water uptake rate in the degradation test. Finally, SEM studies confirmed the attachment and growth of the mouse neural stem and progenitor cells on the scaffold.

Conclusion: These results suggested that the PLLA nano scaffold is an appropriate structure for the growth and differentiation of the neural stem and progenitor cells and the electrospinning technique is an efficient method for the scaffold producing used in the nerve tissue engineering.

Keywords: Tissue engineering, Scaffold, PLLA, Electrospinning, Neural stem cells, Biodegradation

Address: Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, +989143523706

Email: m.golmohammadi@arums.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2015; 25(11): 997 ISSN: 1027-3727

¹ MSc, Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

² Young Researchers and Elite Club, Zahedan Branch, Islamic Azad University, Zahedan, Iran

³ MSc, Department of Biology, Faculty of Biology, University of Kharazmi, Tehran, Iran

⁴ Young Researchers and Elite Club, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

⁵ Assistant Professor, Laboratory of Embryology and Stem Cells, Department of Anatomy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

⁷ Associate Professor, Laboratory of Embryology and Stem cells, Department of Anatomy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran (Corresponding Author)